

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 59221955
PUBLICATION DATE : 13-12-84

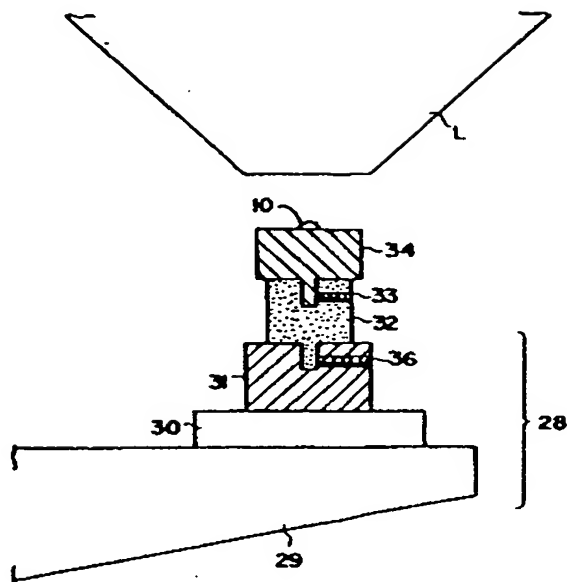
APPLICATION DATE : 31-05-83
APPLICATION NUMBER : 58096660

APPLICANT : INTERNATL PRECISION INC;

INVENTOR : KOIKE HIROTAMI;

INT.CL. : H01J 37/20 // G01N 23/225

TITLE : SPECIMEN OBSERVING METHOD
THROUGH QUICK CRYO-STAGE



ABSTRACT : PURPOSE: To enable at least minimum observation of cut face of a freezed specimen without requiring a preliminary exhaust chamber and stage cooling means by fixing a specimen and specimen table onto the cryo-stage of an electron beam system through an insulator then evacuating the specimen chamber and irradiating electron beam onto the specimen.

CONSTITUTION: A cryo-stage 28 is comprised of a base 29, X-Y moving system 30 and a rotary table 31. Refrigerated specimen 10 and specimen table 34 are fastened through a screw 33 to an insulator 32 fixed to the rotary table 31 through a screw 36. Teflon or other thermally non-conductive member is employed for the insulator 32. The specimen table 34 to be refrigerated by refrigerant together with the specimen 10 has high thermal capacity to maintain said specimen 10 under freezed state for sufficiently long interval during which the specimen 10 is observed. Consequently the cryo-stage 28 is not required to be coupled with any cooling means resulting in simplification of the structure of the cryo-stage 28.

COPYRIGHT: (C)1984,JPO&Japio

⑪ 日本国特許庁 (JP)
⑫ 公開特許公報 (A)

⑬ 特許出願公開
昭59—221955

⑭ Int. Cl.³
H 01 J 37/20
G 01 N 23/225

識別記号 庁内整理番号
7129—5C
2122—2G

⑮ 公開 昭和59年(1984)12月13日

発明の数 3
審査請求 未請求

(全 8 頁)

⑯ 迅速クライオステージによる試料観察方法

⑰ 特 願 昭58—96660
⑱ 出 願 昭58(1983)5月31日
⑲ 発 明 者 井上貴央
米子市河崎3315—89

⑲ 発 明 者 小池紘民
東京都西多摩郡羽村町羽2741—7
⑳ 出 願 人 株式会社国際精工
八王子市暁町1丁目29番19号
㉑ 代 理 人 弁理士 土橋皓

明細書の浄書(内容に変更なし)
明 細 書

1. 発明の名称

迅速クライオステージによる試料観察方法

2. 特許請求の範囲

1) 試料を切り出して試料台上に設置し、

試料及び試料台を冷媒内に浸漬して凍結させ、
凍結せしめられた試料を冷媒内において割断し、

上記試料及び試料台を電子線装置のクライオ
ステージ上に断熱材の介在の下に取付け、

試料に電子線を照射することを特徴とする迅
速クライオステージによる試料観察方法。

2) 試料台は、試料を充分に長時間冷凍状態に保
ち得る程度に大きな熱容量を有することを特徴
とする特許請求の範囲第1項記載の迅速クライ
オステージによる試料観察方法。

3) 試料を切り出して試料台上に設置し、

試料及び試料台を冷媒内に浸漬して凍結させ、
凍結せしめられた試料を冷媒内において割断
し、

試料及び試料台を予備排気室内に挿入し、
この予備排気室内を真空排気し、
予備排気室内で試料を蒸着処理し、

また一方、上記操作手順と並行して電子線装
置の試料室内を真空排気し、

試料及び試料台を試料室内のクライオステー
ジ上に断熱材の介在の下に取付け、且つ試料に
電子線を照射することを特徴とする迅速クライ
オステージによる試料観察方法。

4) 予備排気室内又は試料室内における真空度は
調節可能であることを特徴とする特許請求の範
囲第3項記載の迅速クライオステージによる試
料観察方法。

5) 試料を切り出して試料台上に設置し、

試料及び試料台を冷媒内に浸漬して凍結させ、
上記試料及び試料台を電子線装置の試料室内
のクライオステージ上に断熱材の介在の下に取
付け、

凍結せしめられた試料を試料室内において割
断し、

上記試料室内を真空排気し、
試料に電子線を照射することとを特徴とする迅速クライオステージによる試料観察方法。

3. 発明の詳細な説明

この発明は、試料を凍結した状態で電子顕微鏡で観察する方法に係り、特に観察手順が単純かつ高分解能高倍率での観察が可能な電子線装置における試料の観察方法に係る。

生体試料を例えば走査電子顕微鏡 (SEM) で観察する場合には、化学固定によつて発生する変形を避けるため、試料を超低温で瞬間的に凍結し、試料の形態と内容物とを同時に固定して観察する方法が用いられる場合がある。

この試料を凍結して観察する方法としては例えば第1図に示すような、対物レンズLの直下に設けられた冷却ゴニオステージ1 (以下、迅速クライオステージという) を備えた鏡体2に冷却ステージ3と冷却ナイフ4と蒸着源5と送り用のヒータ (図示していない) 等を備えた予備排気室6をエアロック弁7を介して接続し

特開昭59-221955 (2)

た装置を用いて行なわれている。この装置において、迅速クライオステージ1は鏡体外部に設けられた液体窒素8と熱的に接続されているが、この接続は、迅速クライオステージ1の移動を確保するためと、液体窒素8の沸騰による振動クライオステージ1へ伝達しないため銅製の網が用いられている。予備排気室6内の冷却ステージ3と冷却ナイフ4も予備排気室6外に設けられた液体窒素9と熱的に接続されており、低温に冷却されている。

この装置を用いて試料を凍結して、観察を行なう方法は次の過程をもつて行なわれる。

- (1) 鏡体に冷却ゴニオステージ1と、冷却ステージ3及び冷却ナイフ4等が設けられた予備排気室6設置し、冷却ゴニオステージ1、冷却ステージ3を冷却する。
- (2) 鏡体2内を真空ポンプで排気する。
- (3) 試料10を切り出す。
- (4) 試料10を試料台11に取り付ける。
- (5) 液体窒素等の冷媒で試料を凍結する。

- (6) 試料台11を移送棒 (図示していない) に取り付ける。
- (7) 予備排気室6内の冷却ステージ3上に試料台11を移送棒でマウントし予備排気室6を密封する。
- (7) 予備排気室6を真空ポンプで排気する。
- (8) 冷却ナイフ4を用いて試料10を切断する。
- (9) チャージアップ防止用の蒸着処理を行なう。
- 00 冷却ゴニオステージ1を所定位置に調節する。
- 01 予備排気室6と鏡体2との間のエアロック弁7を開ける。
- 02 試料10を試料台11と共に移送棒で冷却ゴニオステージ1上に設置する。
- 03 予備排気室6と鏡体2との間のエアロック弁8を閉じる。
- 04 試料10の観察を行なう。

また試料を交換して新たな試料の観察を行なうには、次の過程を行なう。

- 05 予備排気室6と鏡体2との間のエアロック弁8を開く。

- 06 試料10を試料台11と共に移送棒で予備排気室6内に移動する。
- 07 予備排気室6と鏡体2との間のエアロック弁8を閉じる。
- 08 予備排気室6に外気を導入して、移送棒で試料10を試料台11と共に取り出す。

更に上記(2)~(4)を繰り返すものである。

またすべての試料の観察を終了した後には、上記(5)~(8)の操作を行ない、鏡体2から冷却ゴニオステージ1と、冷却ステージ3及び冷却ナイフ4等が設けられた予備排気室6を取り外すことによつて終了する。

以上のように、従来の電子線装置における試料の観察方法にあつては、試料を観察するまでには、数多くの過程を経なければならず煩雑なものであるし、一つの試料の観察が終了して、他の試料の観察を行なうまでには、多くの過程と長い時間とを要した。それは、観察を終った試料を取り出す際には、(08の過程) 予備排気室6内に外気を導入して大気圧とするため霜防

止のため冷却ナイフ4及び冷却ステージ3をその度に密着させる必要があるためである。

また一般に試料を凍結して観察する精度は数%程度であるから、その精度、冷却ゴニオステージ1や予備排気室6を鏡体に組み付け、真空チェンク等を行なわなければならないその操作は観察のための操作のうち大きな過剰をしめるものとなり、煩雑なものであつた。

また、上記試料の凍結及び観察を行なう方法に使用される装置にあつては、冷却ゴニオステージ1と冷却ステージ3及び冷却ナイフ4の双方を冷却するため液体窒素の容器(デューワー)を2体設ける必要があり、また鏡室2と予備排気室6に独立して真空ポンプ系を必要とするため装置が複雑で高価なものとなるという不具合があつた。

更に液体窒素8と冷却ゴニオステージ1との熱的連結は、冷却ゴニオステージ1の作動の確保と、液体窒素8の沸騰による泡立ちで発生する振動を冷却ゴニオステージ1に伝えないため、

クステージに代えて冷却用のクライオステージに取換える必要があり、しかもこのクライオステージに液体窒素を使つた冷却器が接続される。しかも鏡体2には予備排気室6を接続すると共に、この予備排気室6内にも液体窒素を使つた冷却器が接続された冷却ステージ3が取付けられている。このため、凍結試料の観察時には各冷却器の運転等による振動がクライオステージ等伝わり、試料の観察を困難にしていたのである。

ところで、上記の如くクライオステージや冷却ステージに冷却器を接続しなければならない必要性について検討する。クライオステージに冷却器を接続するのは、凍結試料を観察している間に当該凍結試料とステージとの間で熱伝導が行われ試料の凍結が緩む恐れがあり、これを防止すべく、試料観察中は冷却し続ける必要があるからである。次に予備排気室内の冷却ステージにも冷却器を接続するのは、従来では予備排気室内で、試料観察のための前処理、とりわ

けの金属で行なわれるが、熱伝導を効率良く行なうため金属の断面積が大きくなり、冷却ゴニオステージ1の移動は制限されるし、振動は完全には遮断されることはなく、高解像、高倍率での観察を行なうことは困難であるという不具合があつた。

この発明は以上のような不具合を悉くなされたものであつて、試料の凍結観察に必要な手順が少なく、必要とする装置が簡易で、かつ高解像高倍率での試料の観察ができる電子線装置の観察方法を提供することを目的とする。

上記目的を達成するために、本発明者は、先ず上記従来例における問題が生じる原因を追究してみた。そして、かかる原因は、従来のような試料観察方法を実施するに当つて使用する必要がある装置が、電子線装置に取付ける付属部品としてはあまりにも大型化され過ぎ、且つ複雑な機構を有していたことによるものであることを究明した。特に従来において凍結試料を観察するためには、通常使用されているゴニオメー

計試料の凍結を行つていたことによる。つまり、試料は冷媒内で凍結された後、この予備排気室内に移され、真空の雰囲気の下で観察されるが、この試料移動のためには少なからず作業時間が必要であり、その間に試料の凍結が緩む恐れがあり、これを防止すべく、試料の前処理中は冷却し続ける必要があるからである。特に上記前処理の中には、試料の凍結の他に煮着処理等が含まれ、これらの作業に要するトータル時間を考えると試料を冷却し続ける必要がある。そしてまた、予備排気室内で、真空の雰囲気の下で試料の凍結等を行うのは、冷媒内で極低温まで冷凍された試料を大気中に晒したままにしておくと、試料表面に霜が付着するというやつかいな問題があるため、従来ではこの霜の付着防止を最大の課題とし、試料を冷媒内から予備排気室内へ素早く移し、ここで前処理を行い、鏡体即ち試料室へ置くという手順によつていたのである。

本発明者は、上記従来方法における手順の各

々を検討し且つこれに用いられる装置構成について見直しを行つた結果次の様を結論に達した。

先ず試体内に配設されたクライオステージは、試料の凍結状態を保持しつつ試料の移動、傾斜を行わせることが役目であるから、試料への熱伝導を遮断してやれば冷却器を接続しなくても凍結状態は充分に保持できるはずである。次に、試料の潤断は予備排気室内で行う必要はなく、基本的には予備排気室は取付つてしまつても支えない。もし予備排気室を使うとしても、当該予備排気室内では試料への蒸気処理程度の作業のみを行い、予備排気室での前処理時間を大幅に短縮すべきである。こうすれば、上記試体内のクライオステージにおけると同様、試料への熱伝導を遮断してやれば、冷却器を接続しなくても予備排気室内で試料の凍結状態は充分保持できるはずである。

かかる点に基づいて、本願発明では凍結試料の観察方法を従来とは大幅に変更した。

以下、本発明の要旨を詳細に述べる。

回転台31にねじ36止めされた断熱材32に更にねじ33によつて締結される。断熱材32にはテフロン、その他の熱不良導体が用いられる。また、試料10と共に冷媒内で冷凍される試料台34は、少なくとも試料10を観察する間は、当該試料10を充分に長い時間冷凍状態に保ち得る様、大きな熱容量を持つ。このため、試料10と試料台34とは、断熱材32の介在によつてクライオステージ28から熱的に切離され、当該クライオステージ28からの熱伝導を受けることなく、試料台34の熱容量に依じて長時間かけて徐々に温度が上昇する。しかし、試料台34は充分に大きな熱容量を持つから、凍結試料が融け過ぎて観察不可能になることはない。このため、クライオステージ28には何ら冷却手段を接続する必要はなく、当該クライオステージ28の構成を簡単にすることができる。そればかりか、クライオステージ28には第3図に示すような通常の試料10a観察を行う場合の試料ステージ（即ち、ゴニオメータステージ）をそのまま使うという、いわ

特開昭59-221955(4)

先ず、本願第1の発明では、予備排気室及びステージ冷却手段が全くなくても最低限の凍結試料の潤断面観察が行い得る方法を確立した。この発明に係る試料観察方法は、試料を切り出して試料台上に載置する段階と、試料及び試料台を冷媒内に没設して凍結させる段階と、凍結した試料を冷媒内において潤断する段階と、上記試料及び試料台を電子線装置のクライオステージ上に断熱材の介在の下に取付け、更に試料室内を真空排気すると共に、試料に電子線を照射する段階とを有して成る。かかる方法を実施するための迅速クライオステージ28（以下、単にクライオステージという）及びこのクライオステージ28への試料10の設置状態を第2図及び第3図に示す。この図において、クライオステージ28は、試体2に固定取付けされた基台29と、この基台29上に取付けられたX-Y移動装置30と、X-Y移動装置30上に載置された回転台31とから成る。かかる構成を有するクライオステージ28上に、冷凍された試料10及び試料台34は、

ゆる共用化ができるため、わざわざ凍結試料観察用のステージを用意して観察方法を变える度にステージを取換える必要がない。これによりコストの低減と操作手順の簡易化を図ることができる。また、凍結せしめられた試料10の潤断は、冷媒の中で行うから、試体2に予備排気室及びこれに接続すべき冷却手段を取付ける必要はない。しかも、この試料10の潤断過程において、試料が大気に出されて霜が付着する恐れはなく、次の段階では試料10は直接試体2内へ移されるから、この移送中における霜の付着は従来における場合と同程度に抑えることができる。よつて、かかる試料観察方法によれば、試料の前処理（特に潤断処理）及び観察を行うためのステージを継続的に冷却する必要がなく、装置の構造を簡単にすると共に設置の取付、取外しに要する操作手順を省略できるという利点がある。

本願第2の発明に係る試料観察方法は、上記第1の発明と同様、試料10を冷媒内に没設した

状態で切断した後、凍結試料 10 及び試料台 34 を予備排気室内に挿入する段階と、この予備排気室内を真空排気する段階と、予備排気室内で試料 10 に蒸着処理を施す段階と、上記各段階での操作とは並行して電子線装置の試料室内を真空排気する段階と、試料 10 及び試料台 34 を試料室内のクライオステージ上に断熱材の介在の下に取付け、更に試料 10 に電子線を照射する段階とを有して成る。かかる方法を実施するためのクライオステージ及びその周辺部材が第 4 図及び第 5 図に示してある。この図において用いられるクライオステージ 40 は、電子線装置の電子線軸に対して直角方向から試料の出し入れを行う、いわゆるサイドエントリータイプのゴニオステージから構成される。このクライオステージ 40 は、電子線装置の側壁から外方へ突出して延びた管状体 51 内に回転及びスラスト運動可能に取付けられた保持棒 43 と、ホルダ 44 と、電子線装置の側壁に取付けられ且つ試料移動用のアーム 42 を有する試料移動機構 41 とから成る。管

状によつてクライオステージ 40 から熱的に隔離される。

かかる装置において、凍結せしめられた試料 10 は冷媒の中で凍結されホルダ 44 上に載せられて先づ予備排気室 45 内へ入る。そして、この予備排気室 45 と試料室 52 との間をエアロックした後予備排気室 45 内を真空排気し、試料 10 への蒸着を行う。そして、この蒸着処理が終了した後、試料 10 は試料室 52 内へと挿入され、所定の位置にセットされて試料観察が行われる。試料 10 及び試料台 34 はクライオステージから熱的に隔離されているから、試料 10 は、試料台 34 の熱容量に応じて徐々に温度が上昇する。また試料台 34 は充分に大きな熱容量を持つから、凍結試料が暖まり過ぎて観察不可能になることはない。よつて、クライオステージ 40 には何ら冷却手段を設ける必要はなく、当該クライオステージ 40 の構成を簡単にすることができる。また予備排気室 45 についてみても、この予備排気室 45 内では、従来における如く試料 10 の凍結を行わない

特開昭 59-221955 (5)

状態 51 の内部には予備排気室 45 が形成されると共に、エアロック弁 46 によつて試料室 52 から隔離されている。またこの予備排気室 45、試料室 52 内には蒸着源 48、49 がそれぞれ設置されている。なお図中、符号 47 及び 50 は予備排気室 45 及び試料室 52 を真空排気するための排気管である。かかる構成を有するクライオステージ 40 上に冷凍された試料 10 及び試料台 34 を載置するには、保持棒 43 をホルダ 44 と管状体 51 から引抜き、ホルダ 44 上の所定の場所に試料 10 を載せた試料台 34 を装填した後、再度保持棒 43 を管状体 51 先端から電子線装置内へ挿入して行う。ホルダ 44 は断熱材 53 を介して保持棒 43 に固定され、また断熱材 54 を介して試料移動アーム 42 に連結されるようになっている。断熱材 53、54 には上記第 1 の発明におけると同様、例えばテフロン、その他の樹脂といった熱不良導体を用いられる。また試料台 34 は、試料 10 を充分に長い時間冷凍状態に保ち得る様、大きな熱容量を持つ。このため、試料 10 と試料台 34 とは断熱材 53、54 の介

ため、この予備排気室 45 内での前処理時間は大幅に短縮される。したがつて、試料 10 が予備排気室 45 内で処理されている間に当該試料 10 を継続的に冷却する手段は不要となり、コストの低減及び装置内での振動の発生防止を図り得る上、操作手順の簡素化を図り得るという利点がある。

次に、本願第 3 の発明に係る試料観察方法は、試料 10 を試料台 34 と共に冷媒の中で凍結させる点については上記第 1 の発明及び第 2 の発明と同様であるが、上記操作段階に引続いて、試料 10 及び試料台 34 を電子線装置のクライオステージ上に断熱材の介在の下に取付ける段階と、凍結せしめられた試料を試料室内において凍結する段階と、試料室内を真空排気すると共に試料に電子線を照射する段階とから成っている。即ち、試料 10 及び試料台 34 は冷媒内にて冷凍された後、第 6 図に示すように直ちに試料室内のクライオステージ 28 上に断熱材 32 の介在の下に取付けられ、その後試料 10 はナイフ 35 等の道具によつて切断され、第 7 図に示すようになる。な

お、同図中のクライオステージ 28 は第 2 図に示されたものと同じ構成を有するから説明を省略する。また断熱材 32 の材質、試料台 34 の特性等についても、上記断熱材、試料台と同じである。

したがって、この第 3 の発明においても、上記第 1 の発明におけるとはほぼ同様、試料 10 及び試料台 34 はクライオステージ 28 から熱的に隔離され、断熱クライオステージ 28 の影響を受けることはないで、冷却手段は不要となる。また、通常観察用の試料ステージを凍結試料観察用にも共用できるから装置の有効利用が図られる。更にまた、凍結せしめられた試料 10 は試料室内で切断されるから、予備排気室及びこれに接続すべき冷却手段を取付ける必要はない。よってかかる試料観察方法によれば、試料の切断等の前処理及び観察を行うに際して、ステージを常に冷却し続ける必要がなく、装置の構造を簡単にすると共に観察操作をより簡易化することできるという利点がある。

以上説明したように、本願発明によれば、冷

却手段を使用しなくても凍結試料に対する前処理を充分に行うことが出来、しかも試料観察を行うことが出来るようになった。このため、凍結試料の観察に用いる装置の構造をより一層簡単に出来る上、同じステージを通常試料観察と凍結試料観察とに共用できるという利点が得られる。さらに、装置の簡単化に伴い、凍結試料の観察時における操作手順が大幅に軽減され、観察作業のスピードアップを図り得ると共に、余計な器材による振動発生がなくなつたため、極めて高品質の試料観察像が得られるという所期以上の効果を奏することができた。

4. 図面の簡単な説明

第 1 図は、従来の凍結試料の観察に用いられるクライオステージの構成を概略的に示す図、第 2 図は本願第 1 発明の実施に用いられるクライオステージを示す図、第 3 図は上記クライオステージを通常試料の観察に用いる状態を示す図、第 4 図は本願第 2 発明の実施に用いられるクライオステージを示す図、第 5 図は第 4 図のク

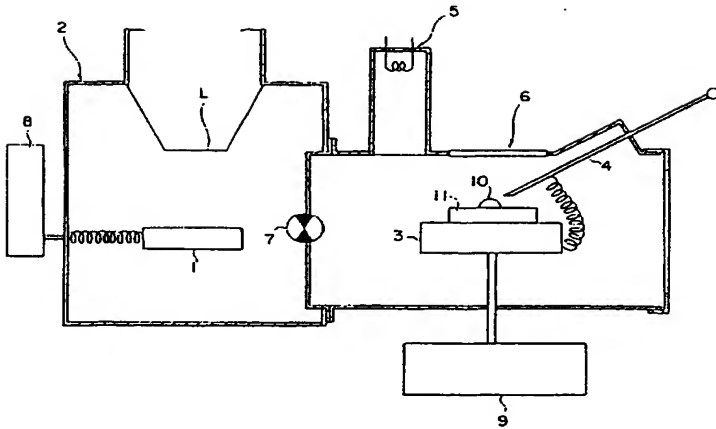
ライオステージにおける試料設置を拡大して示す同図中 V-V 線における断面図、第 6 図は本願第 3 の発明の実施に用いられるクライオステージ及び実施の図様を示す図、第 7 図は第 6 図において試料の切断を行つた後の試料及び試料台の構成を示す断面図である。

- | | |
|----------------------------|-------------------|
| 1, 28, 30... (迅速) クライオステージ | |
| 2... 鏡体 | 3... 冷却ステージ |
| 10, 10a... 試料 | 32, 53, 54... 断熱材 |
| 34... 試料台 | 45... 予備排気室 |
| 48, 49... 蒸気源 | 52... 試料室 |
| B... 電子線装置 | L... 対物レンズ |

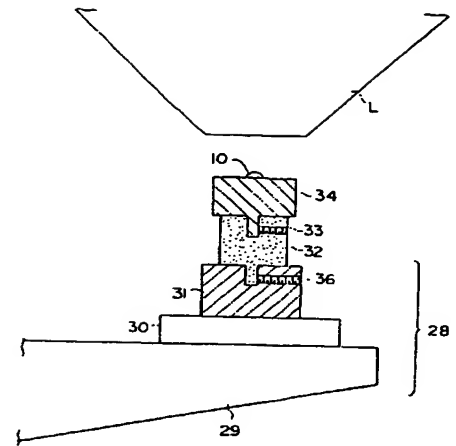
特許出願人 株式会社 国際精工
代理人 弁理士 土橋 啓

図面の浄画(内容に変更なし)

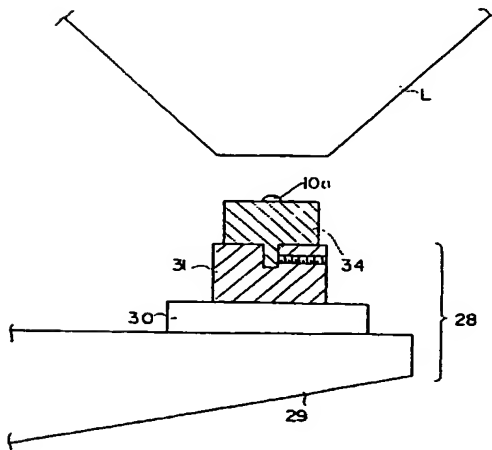
第 1 図



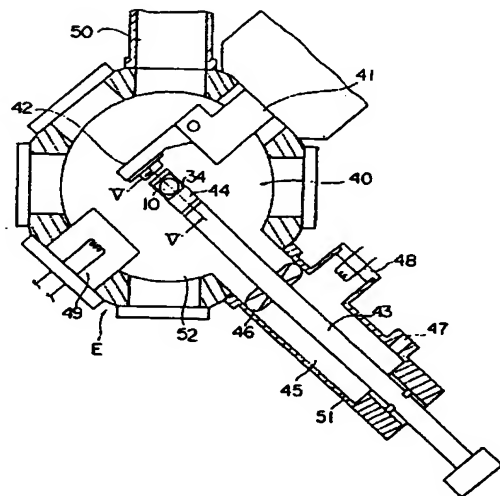
第 2 図



第 3 図

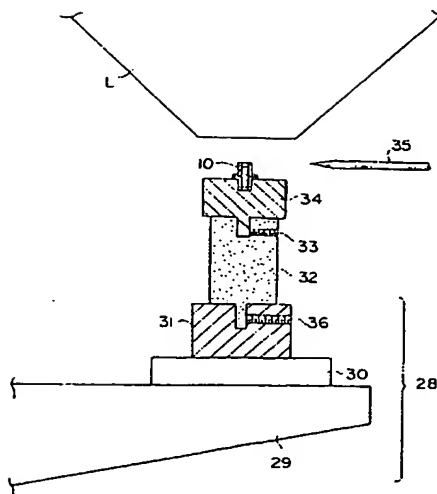


第 4 図

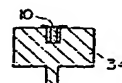


特開昭59-221955(B)

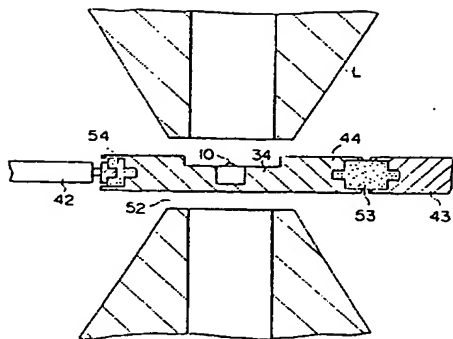
第 6 図



第 7 図



第 5 図



手続補正書（方式）

昭和 58 年 6 月 23 日

特許庁長官 若 杉 和 夫 殿

1. 事件の表示

昭和 58 年 特 許 第 96660 号

2. 発明の名称 迅速クライオステージによる試料観察方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 東京都八王子市睦町 1 丁目 29 番 19 号

氏 名 (名称) 株式会社 国 際 精 工

4. 代 理 人 〒105 電話 580-8931 番

住 所 東京都港区虎ノ門 1 丁目 17 番 3 号
第 12 森ビル 6 階

氏 名 (7519) 弁 理 士 土 橋 昭 一

5. 補正命令の日付（自発）

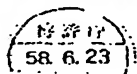
6. 補正により増加する発明の数

7. 補正の対象

明細書及び図面の修正（内容に変更なし）

8. 補正の内容

別紙の通り



This Page Blank (uspto)